

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-509745

(43) 公表日 平成8年(1996)10月15日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 38/43
35/16

識別記号

庁内整理番号

9455-4C
7431-4C

F I

A 6 1 K 37/465
35/16

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平6-524703
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)3月24日
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)11月2日
(86) 国際出願番号 P C T / S E 9 4 / 0 0 2 6 5
(87) 国際公開番号 W O 9 4 / 2 6 2 8 6
(87) 国際公開日 平成6年(1994)11月24日
(31) 優先権主張番号 9 3 0 1 5 8 1 - 6
(32) 優先日 1993年5月7日
(33) 優先権主張国 スウェーデン (S E)

(71) 出願人 ファーマシア アクチボラーグ
スウェーデン国, エス-171 97 ストックホルム (番地なし)
(72) 発明者 オステルベルグ トーマス
スウェーデン国, エス-116 22 ストックホルム, フォルクンガガータン 88 ビー
(72) 発明者 ファトゥロス アンゲリカ
スウェーデン国, エス-113 38 ストックホルム, トムテボガータン 35
(74) 代理人 弁理士 土橋 秀夫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 因子V I I I の酸素低減水溶液

(57) 【要約】

本発明は低減された酸素濃度を有する水溶液中の凝固因子V I I I を含む最終医薬品に関する。この方法において、因子V I I I 活性は貯蔵の間中意外に高い度合いに保持され得る。因子V I I I 活性は、最終医薬品がさらに不活性ガスおよび/または抗酸化剤を含む場合に、延長された時間周期に関して保持され得る。本発明はまた水溶液の酸素濃度を低減するための方法、および不活性ガス雰囲気下で溶液を貯蔵することにより水溶液中の因子V I I I の安定性を改善する方法に関する。本発明により2ないし10℃の温度および6.5ないし8.5の溶液のpHで少なくとも6ヶ月間貯蔵後因子V I I I の初期活性の少なくとも50%を保持することができる。

【特許請求の範囲】

1) 貯蔵中に本質的に因子V I I I 活性を保持するために、低減された酸素濃度を有する水溶液中において10～100000IU/mlを有する凝固因子V I I I を含むことを特徴とする最終医薬品。

2) さらに不活性ガスを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の最終医薬品。

3) 前記不活性ガスが窒素であることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の最終医薬品。

4) 水溶液がさらに、グルタチオン、アセチルシステイン、メチオニン、トコフェロール、ブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールまたはフェノール化合物のごとき少なくとも1つの抗酸化剤を含有することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

5) 抗酸化剤がグルタチオン、アセチルシステインおよびメチオニンからなるグループから選択された少なくとも1つの化合物であることを特徴とする請求の範囲第4項に記載の最終医薬品。

6) 凝固因子V I I I が高度に精製されかつ溶液がアルブミンの添加なしに安定であることを特徴とする請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

7) 凝固因子V I I I が組み換え因子V I I I の全長または削除派生物であることを特徴とする請求の範囲第

1項ないし第6項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

8) 活性凝固因子V I I I が50～10000IU/mlであることを特徴とする請求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

9) 水溶液がさらに非イオン表面活性剤を含有することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

10) 非イオン表面活性剤が臨界膠質粒子濃度以上の量において存在することを特徴とする請求の範囲第9項に記載の最終医薬品。

11) 非イオン表面活性剤がブロック共重合体またはポリオキシエチレンソル

ビタミン脂肪酸エステルから選ばれることを特徴とする請求の範囲第9項または第10項に記載の最終医薬品。

12) 水溶液がさらに塩化カルシウムまたはグルコン酸カルシウムごときカルシウム塩を、好ましくは0.5 mM以上の量において含有することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第11項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

13) 水溶液がさらに、1 mM以上の量において、L-ヒスチジンのごとき、アミノ酸を含有することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第12項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

14) 水溶液がさらに、単または二糖類または砂糖アルコール、好ましくはスクロースを含有することを特徴

とする請求の範囲第1項ないし第13項にいずれか1項に記載の最終医薬品。

15) i) 10~100000 IU/mlの組み換え凝固因子VIIIIと、
ii) 少なくとも0.01 mg/mlのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルと、

iii) 好ましくは0.1 mM以上の量において、塩化ナトリウムと、

iv) 好ましくは0.5 mM以上の量において、塩化カルシウムまたはグルコン酸カルシウムのごとき、カルシウム塩と、

v) 好ましくは1 mM以上の量において、L-ヒスチジンのごときアミノ酸と、

vi) 単または二糖類または砂糖アルコール、好ましくはスクロースまたはマンニトールと、

を含有する水溶液からなることを特徴とする請求の範囲第1項ないし第14項のいずれか1項に記載の最終医薬品。

16) 凝固因子VIIIIを活性が10~100000 IU/mlであるような水溶液と混合しかつ該溶液を不活性ガス雰囲気に従わさせることにより酸素濃度を低減することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載の溶液の製造方法。

17) 凝固因子VIIIIを水溶液と混合し、そしてまず圧力を低減しかつその後不活性ガスを、好ましくは数

サイクルにおいて繰り返して、導入することにより酸素濃度を低減することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載の溶液の製造方法。

18) 水性緩衝溶液により最後の精製工程から凝固因子V I I Iを抽出し、そして酸素濃度を溶液を不活性ガス雰囲気に従わせることにより酸素濃度を低減することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載の溶液の製造方法。

19) 水性緩衝溶液により最後の精製工程から凝固因子V I I Iを抽出し、そしてまず圧力を低減しかつその後不活性ガスを、好ましくは数サイクル繰り返して、導入することにより酸素濃度を低減することを特徴とする請求の範囲第1項ないし第15項のいずれか1項に記載の溶液の製造方法。

20) 水溶液が非イオン表面活性剤、抗酸化剤、L-ヒスチジンのごときアミノ酸、ナトリウム塩、カルシウム塩およびスクロースからなるグループから選択された少なくとも1つの添加物を含有することを特徴とする請求の範囲第16項ないし第19項のいずれか1項に記載の溶液の製造方法。

【発明の詳細な説明】

発明の名称

因子V I I Iの酸素低減水溶液

技術分野

本発明は低減された酸素濃度を有する水溶液中の凝固因子V I I Iを含む最終医薬品に関する。この方法において、因子V I I I活性は貯蔵の間中意外に高い度合いに保持され得る。因子V I I I活性は、最終医薬品がさらに不活性ガスおよび／または抗酸化剤を含む場合に、延長された時間周期に関して保持され得る。本発明はまた水溶液の酸素濃度を低減するための方法、および不活性ガス雰囲気下で溶液を貯蔵することにより水溶液中の因子V I I Iの安定性を改善する方法に関する。本発明により2ないし10℃の温度および6.5ないし8.5の溶液のpHで少なくとも6ヶ月間貯蔵後因子V I I Iの初期活性の少なくとも50％を保持することができる。

発明の背景

たんぱく質の安定性は一般に製薬産業における問題である。それはしばしば凍結乾燥のごとき、種々の乾燥方法においてたんぱく質を乾燥することにより解決された。たんぱく質はその後乾燥された形状において分配されかつ貯蔵された。乾燥または凍結乾燥前の溶液、乾燥された材料および再組成された製品はすべて、乾燥工程において、ならびに貯蔵または取扱いの間中活性の実質的な損失を回避するために、安定にすべきである。凍結乾燥

方法はコストが高くかつ時間を消費する方法工程であり、それはこの工程が、大量生産品を製造するとき、回避され得るならば大きな利点である。そのうえ、患者は使用前に溶媒中で乾燥たんぱく質を必ず再組成しなければならず、それは患者にとって不都合である。

血友病は数世紀にわたって知られた遺伝によつて受け継がれた病気であるが、それは種々の形状、すなわち血友病A、血友病Bおよび血友病C間で区別を生じることが可能となつたのは単に最近30年以内である。血友病Aは最も頻繁な形状である。それは10000live-bomの男性に関して1人または2人の

発病率で男性のみに影響を及ぼす。その病気は血漿中に通常存在するたんぱく質である生物学的に活性の凝固因子V I I I（抗血友病因子）の強力に減少されたレベルまたは不存在により発生される。血友病Aの臨床的現れは強い出血傾向でありかつ因子V I I Iによる処理前に濃縮物が導入され、それらの患者の平均年齢は20才以下であつた。血漿から得られた因子V I I Iの濃縮物が約30年にわたつて利用可能であつた。これは血友病患者の治療の状況をかなり改善しかつそれらに通常の寿命で生きる可能性を付与した。

治療因子V I I I濃縮物はこれまで血漿の分別により製造された。しかしながら、例えばジエイ・ギツツシヤア氏等著、1984年、ネイチャー、第312巻、第330頁乃至第37頁およびヨーロッパ特許第16045

7号明細書に報告されたような組み換えDNA技術を使用する細胞培養中の因子V I I Iの製造に利用し得る方法がある。

ヒト血漿から得られた因子V I I I濃縮物は幾つかの破片にされた完全に活性の因子V I I I形状を含有する（アンダーソン氏等著、1986年5月、米国国内化学学会会報、第83巻、第2979頁乃至第2983頁）。最小の活性形状は170kDaの分子量を有しかつ金属イオンブリッジによりともに保持される90kDaおよび80kDaの2つの鎖からなる。ここでヨーロッパ特許第197901号明細書を引用する。カビ・ファーマシアは治療因子V I I I濃縮物中の170kDa血漿因子V I I I形状に対応する組み換え因子V I I I製品を開発した。切断された組み換え因子V I I I分子はr-V I I I S Qと呼ばれかつ有限通路で漿液なしの媒体中での細胞培養方法においてチャイニーズハムスター卵巣（CHO）により製造される。

r-V I I I S Qの特別な活性は約15000IU V I I I : C / mgたんぱく質である。

組み換え因子V I I I S Qは典型的な血友病の治療に必要とされる。投与量は血漿因子V I I I濃縮物の投与量と同様である。

組み換え因子製品の構造および生化学的特徴はチブテッチ、1991年、第9巻および1991年、血液学、第63巻、第155頁乃至第165頁においてカ

ウフマ

ンにより記載された。r-VIIISQの構造および生化学的特徴は国際特許出願公開第WO91/09122号に記載された。

血漿から分別された因子VIIは通常水により再組成されるべき凍結乾燥粉末として販売されている。

低量のたんぱく質との調合は包装において、精製、殺菌製造の間中および投与の間中一般に活性を緩める。この問題は通常活性たんぱく質の損失をかなり低減するヒトアルブミンの添加により解決される。ヒトアルブミンは精製、殺菌製造および凍結乾燥の間中全体的な安定剤として作用する(1988年、パレンテラル・サイエンス・アンド・テクニク・ジャーナル、第42巻、第125号、補遺、ワング等による論評参照)。因子VIIの安定化のためのアルブミンの使用は公知でありかつ市場であらゆる高度に純化された因子VII製品に現在使用されてるいる。

しかしながら、組み換えDNA技術により製造された治療たんぱく質へのヒトアルブミンの添加を回避することが望ましい。加えて、調合賦形剤としてのヒトアルブミンの使用はしばしばたんぱく質特徴の多くの最も強力なかつ敏感な分析方法の使用を制限する。

幾つかの解決が種々のたんぱく質の安定化のために提案された。かくして、ヨーロッパ特許第35204号明細書(カッター)はポリオールが存在においてたんぱく質組成物へ熱安定性を付与する方法を開示している。そ

のうえ、国際特許出願公開第WO-A-89/09614号公報(ジェネンテック)はグリシン、マニトールを含むヒト成長ホルモンの安定化された調合を開示しかつ緩衝剤が開示されそして好適な実施例においてホホリソルベート80のごとき非イオン表面活性剤が添加されている。非イオン表面活性剤は凝集および変性を低減するために添加される。調合は凍結乾燥調合においてかつ再組成時安定性を増加させる。また、米国特許第4783441号明細書(フックスト)はインシュリンのごときたんぱく質および表面活性物質からなる水溶液を開示してい

る。

ヨーロツパ特許第77870号明細書(グリーン・クロス)は因子V I I Iを含有する溶液の安定性を改善するためにアミノ酸、単糖類、オリゴ糖または砂糖アルコールまたは炭化水素カルボキシル酸の添加を開示する。ヨーロツパ特許第117064号(グリーン・クロス)は熱処理の間中安定性を増加するために因子V I I Iの水溶液への砂糖アルコールまたは二糖類の添加を開示している。

国際特許出願公開第WO-A-91/10439号(オクタファルマ)は二糖類、好ましくはサツカロースおよび1つまたはそれ以上のアミノ酸を含む因子V I I Iまたは因子I Xの安定した注入可能な溶液を請求しておりそしてヨーロツパ特許第314095号(ローラー)は異なるイオン強度を有する因子V I I Iの安定した調

合を請求している。

米国特許第4727027号(ダイヤモンド・サイエンティフィック)は、活性の損失を最小にするために、血液または血液成分から得られた生物学的に活性のたんぱく質を含有する水性組成物の光化学除染方法に向けられる。該方法は組成物に少なくとも1つのフロクマリンを添加しかつ得られた組成物を紫外線(U V)光で照射することからなる。照射前に、水性組成物の酸素濃度は変性を禁止するために低減され得る。これは、例えば、酸素掃去剤、アルブミンおよび／または酵素系の添加および／または不活性ガスでの洗い流しにより達成され得る。因子V I I Iを含有する溶液は6時間までアスコレートとともにまたはそれなしでアルゴンにより洗い流された。米国特許第4727027号は延長された時間についての溶液の貯蔵、ならびにかかる貯蔵中の因子V I I Iについての低減された酸素濃度の考え得る効果については黙している。

ヨーロツパ特許第0212040号(イムノ)は酸素低減環境中の乾燥物質の加熱による因子V I I Iのウイルス不活性化に関する。熱処理は、安定化剤がまたウイルスを保護しそれにより処理の効率を低減するので、安定化剤の不存在において実施される。試験は30時間90℃で実施される。ヨーロツパ特許第0212040号は、一般に乾燥製品の不十分な安定性より克服するのが非常により

困難な問題である、因子V I I Iを含有する

水溶液の不十分な安定性の問題について黙している。これは化学変化のためであり、例えば加水分解およびアミド分解は乾燥状態におけるより溶液中に非常に多く著しい。

たんぱく質は物理-化学特性に関連して異なる。物理的に許容可能でかつ長期間安定である医薬製剤を製造するとき、たんぱく質の特性が考慮されるだけでなくまた他の性状も考慮されるべきである。後者の例は工業用製造、ならびに取扱いの容易さおよび患者に対する安全性である。これらの性状の結果は種々の調合を試験するとき予測可能でなくかつしばしば各たんぱく質に関して独特な解決である。

たんぱく質がアルブミンの添加なしでかつ延長された貯蔵寿命により安定した溶液として患者に調合されかつ分配され得るならば因子V I I Iの使用および製造を容易にする。また患者に関してかかる溶液は最終乾燥製品 of 取扱いを容易にする。患者はかくして再組成なしに直接最終乾燥製品の内容を注射することができる。

たんぱく質以外の薬品を含む酸素過敏化学化合物を含有する水溶液は以下のごとく酸素を除去する。すなわち、注射用水は酸素の濃度を低減するために窒素で泡立たされる。成分が分解されそして溶液が窒素で泡立たされかつその後窒素ブランケットにより保持される。充填の間中、瓶は窒素ガスで洗い流されかつ瓶は窒素の流れにより閉止される。

しかしながら、ガスで泡立たせることによりたんぱく質溶液から酸素を除去することはできない。たんぱく質溶液は激しく泡立ちそして凝固因子V I I Iのごとく多くのたんぱく質薬品は、かかる処理に曝される場合に変性される。それゆえ、凝固因子V I I Iを含有する水溶液が窒素のごとき不活性ガス下で貯蔵されるべきことは以前には決して示唆されていなかった。

発明の説明

しかしながら、凝固因子V I I Iを含有する溶液がたんぱく質変性なしに酸素

が除去され得ることを見出した。かくして、非常に驚いたことに凝固因子V I I Iがアルブミンなしに安定化され、そして低い酸素含量の水溶液が例えば2～8℃で貯蔵されるとき安定であることを見出した。

かくして本発明は貯蔵の間中本質的に因子V I I I活性を保持するために、低減された酸素濃度を有する水溶液中に凝固因子V I I Iを含む最終医薬品に関する。

因子V I I Iは血漿因子V I I Iまたは組み換え因子V I I Iにすることができる。因子V I I Iが組み換え型であるときその全長形状または好ましくはその削除派生物にすることも可能である。より好ましくは、削除派生物は組み換え削除派生物F V I I I S Q (r - V I I I S Q) である。

因子V I I I活性は10～100000IU/ml、好ましくは50～10000IU/mlにすることがで

きる。

例において使用される因子V I I Iは高度に純化され、すなわち5000IU/mlたんぱく質の特別な活性を有し、そして本発明による組成物はアルブミンの添加なしで安定化される。

酸素の濃度は水溶液を不活性ガス雰囲気に従わせるか、またはまず圧力を低減しかつその後不活性ガスを導入することにより低減され得る。後者の工程が好ましくは数サイクルにおいて繰り返される。この方法により溶液中の酸素含量は、因子V I I I活性の実質的な損失なしに、低いレベルに低減され得る。溶液中の酸素含量は200ppm以下、適切には50ppm以下、好ましくは10ppm以下でかつより好ましくは2ppm以下である。使用される容器中の酸素の含量は、好ましくは溶液を不活性ガス雰囲気に従わさせることにより、同一方法において低減され得る。

最終医薬品はその最終容器中で調合された薬品に関する。本発明において適切な容器は例えばガラス瓶、注射器および注入装置である。

溶液は低い酸素含量を本質的に維持するために、窒素、アルゴンまたはヘリウムのごとき不活性ガス下で適切に貯蔵される。不活性ガスは好ましくは非希ガス

、かつ好ましくは窒素である。

低い酸素含量がまた水溶液に抗酸化物質を添加することにより実質上維持され得る。したがって、好ましくは、

溶液はさらに、グルタチオン、アセチルシステイン、メチオニン、トコフェロール、ブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールまたはフェノール化合物のごとき少なくとも1つの抗酸化剤を含有する。好ましくは、抗酸化剤はグルタチオン、アセチルシステインおよびメチオニンからなるグループから選ばれた少なくとも1つの化合物である。EDTAおよびクエン酸のごとき複合剤はさらに因子V I I Iの安定性を改善し得る。

抗酸化剤の量は使用される化合物に依存する。それゆえ、濃度または量は一般的に示すことができない。しかしながら、使用される場合に、抗酸化剤の量は薬学的に許容し得る量にすることが重要である。

溶液のpHは適切には6.5～8.5かつ好ましくは約7である。

非イオン表面活性剤が好ましくは溶液中に存在する。非イオン表面活性剤は、もしも存在するならば、ポロキサマーのごときブロック共重合体またはポリソルベート20またはポリソルベート80のごとき、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルから好ましくは選ばれる。

非イオン表面活性剤は、存在するならば、臨界膠質粒子濃度(CMC)以上の量において使用される。ワン・アンド・リー著、1974年、医療化学ジャーナル、第63巻、第136頁参照。ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルはかくして好ましくは少なくとも0.

0.1 mg/mlの量において使用される。

水溶液はさらに、好ましくは0.1 M以上の量において、塩化ナトリウムまたはカリウムを含有することも可能である。

因子V I I Iの重いおよび軽い鎖の関係はカルシウム(または他の二価の金属イオン)の存在に依存する。ここでカルシウムは塩化カルシウム(CaCl_2)として添加されたが、グルコン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウムまたはカ

ルシウムグルセプタートのごとき他の塩が、好ましくは0.5 mM以上の量において、使用され得る。

水溶液は適切に、1 mM以上の量において、L-ヒスチジン、リシンおよび／またはアルギニンのごとき、アミノ酸を含有する。スクロースまたは砂糖アルコールのごとき単または二糖類が添加され得る。好ましくは、溶液はL-ヒスチジンおよびスクロースを含有する。

最終医薬品は好ましくは、

- i) 10～100000 IU/mlの組み換え凝固因子V I I I
- ii) 少なくとも0.01 mg/mlのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル
- iii) 好ましくは0.1 mM以上の量において、塩化ナトリウム
- iv) 好ましくは0.5 mM以上の量において、塩化カルシウムまたはグルコン酸カルシウムのごとき、カルシ

ウム塩

- v) 好ましくは1 mM以上の量において、L-ヒスチジンのごときアミノ酸
 - vi) 単または二糖類または砂糖アルコール、好ましくはスクロースまたはマニトール
- を含有する水溶液からなる。

この溶液に薬学的に許容し得る量において抗酸化剤が添加され得る。

最終医薬品はかくして使用に備えた安定した水溶液からなる。

本発明の溶液は凝固因子V I I Iが水溶液と混合されるか、または凝固因子V I I Iが水溶液により最後の純化から抽出される方法により製造され得る。水溶液は適当に、非イオン表面活性剤、抗酸化剤、L-ヒスチジン、ナトリウム塩、カルシウム塩およびスクロースのごときアミノ酸からなるグループから選ばれた少なくとも1つの添加物を含有する。

本発明はまた水溶液中の凝固因子V I I Iの安定性を改善し、それにより溶液が不活性ガス雰囲気下で貯蔵される方法に関する。本発明はさらにそれにより2～10℃の温度および6.5～8.5の溶液のpHで少なくとも6ヶ月間貯蔵後

少なくとも50%、かつ実際には80%の初期因子V I I I活性を維持することができる方法に関する。本発明を使用することにより因子V I I I活性の相当な損失なしに、12ヶ月かつ実際に24ヶ月間

水溶液中に因子V I I Iを含む最終医薬品を貯蔵することができる。本方法は、例中に示されるデータがr-V I I I S Qが $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ で窒素下で貯蔵されるとき少なくとも6ヶ月間実質上安定であることを示すので、因子V I I Iがr-V I I I S Qであるときとくに適用可能である。

以下の例は本発明を示しかつ本発明による窒素およびアルゴン中でのかつ比較のために空気中での処理を受けたときの、種々の水溶液に関する安定性データを示す。本発明はこれらの例に限定されない。

実験

材料および方法

組み換え因子V I I I (r-V I I I S Q)の製造は実質上国際特許出願公開第WO A-91/09122号公報に記載されたと同様に実施された、例1~3。DHFR不完全なCHOセリン(DG44N, Y.)がr-V I I I S Q遺伝子を含有する表現ベクトルおよびジヒドロ葉酸塩レダクターゼ遺伝子を含有する表現ベクトルによりエレクトロポレイティングされる。選択的なメディアについての選択に続いて残存しているコロニーが成長によつてメトレキサートの段階的に増加する量において増幅される。結果として生じるコロニーからの上清は因子V I I I活性に関して個々に遮蔽される。製造コロニーが選ばれかつこれは定義された媒体中で漿液なしの懸濁液成長に結果として適合させられかつ最後に大規模

発酵方法が開発された。上清は或る時間周期後集められかつさらに以下で説明されるごとく純化された。

浄化され調節された媒体はpH調整されかつS-セフアローズFFコラムに加えられた。洗浄後、因子V I I Iが5 mM CaCl_2 を含有する塩類緩衝液により抽出された。

免疫吸着がりガンドが因子V I I Iの重い鎖に向けられる単一細胞に由来する細胞である抗体(8A4)である場合に免疫親和性樹脂について実施される。コラムに負荷する前にS-抽出物は0.3%TNBPおよび1%オクトキシノール9により処理された。

コラムは平衡させられ、洗浄されそして因子V I I Iが0.05M CaCl_2 および50%エチレングリコールを含有する緩衝液により抽出された。mAb-抽出物はQ-セファローズFFコラム上に負荷され、抽出緩衝液により免疫親和性段階において平衡させられた。洗浄後、因子V I I Iは0.05M L-ヒスチジン 、4mM CaCl_2 、0.6M NaCl 、pH6.8により抽出された。

Q抽出物がゲル濾過コラム(スーパーデックス200p.g.)に加えられた。平衡および抽出が例による組成物を付与する調合緩衝剤により以下で実施された。

r-V I I I S Qのバルク材料が最終精製工程から受容された。因子V I I Iの活性および不活性成分の濃度が適切な緩衝剤で希釈することにより調整された。溶液

は次いで殺菌濾過され(0.22 μm)かつ分配されそして溶液を低減された圧力に従わせかつその後数サイクルにおいて不活性ガスを導入することにより酸素が除去された。

凝固因子V I I Iの活性が発色体基板試薬(コーテスト・ファクターV I I I、クロモゲニクス・エービー、スエーデン、ムルンダル)により評価された。活性化された因子X(Xa)が因子V I I Iが共同因子として作用する固有の通路を介して発生される。因子Xaは次いでトロンビンによる基板の加水分解を阻止するためにトロンビン禁止剤1-2581の存在において合成発色体基板、S-2222の使用により決定される。反応は酸により停止され、そしてpNA(パラニトロアニリン)の解放に比例するV I I I : Cが試薬ブランクに対して450nmで測光法で決定される。因子V I I I : Cの単位はWHOにより確率された現行の国際濃度規格(IS)により定義されたような国際単位(IU)で表される。

例1. 空気または窒素下で貯蔵された溶液間の比較

組み換え因子V I I I が実験により説明された方法にしたがって製造された。

溶液は3つの異なる温度、それぞれ7, 25℃および30℃で貯蔵された。

ガラス瓶中に分配された量は2 mlであつた。

表1

組成は以下のごとくであつた。

	1 A	1 B	1 C	1 D	1 E	1 F
L-ヒスチジン、mM	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7
塩化ナトリウム、M	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
塩化カルシウム、mM	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
ポリソルベートmg/ml	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
pH	7	6	7	7	6	7
ヘッドスペース	N ₂	N ₂	空気	N ₂	N ₂	空気
V I I I ; C IU/ml						
初期	267	258	267	260	259	260
3ヶ月、7℃	238	219	-	224	151	-
6ヶ月、7℃	217	186	158	204	84	20
1ヶ月、25℃	220	-	-	232	-	-
3ヶ月、25℃	198	-	-	186	-	-
1ヶ月、30℃	210	181	136	210	160	8
3ヶ月、30℃	158	126	26	152	54	2

7℃での酸素の不存在が溶液として貯蔵されたとき6ヶ月後V I I I : Cの許容し得る回収を付与することが例から明らかである。同様に25または30℃で本発明による溶液は過度の活性損失なしに貯蔵され得る。さらに理解され得ることは、安定性が6のpHより7のpHで良好であつたということである。

例2. 抗酸化剤およびスクロースを含有する溶液

組み換え因子V I I I が実験により説明された方法にしたがって製造された。

溶液は2つの異なる温度、それぞれ7, および25℃で貯蔵された。

ガラス瓶中に分配された量は2 mlであつた。

表 2

組成は以下のごとくであつた。

	2 A	2 B
塩化ナトリウム、M	0.31	0.31
塩化カルシウム、mM	3.7	3.7
ポリソルベートmg/ml	0.23	0.23
L-ヒスチジン、mM	14.7	59
スクロース、mg/ml	200	200
グルタチオン、mg/ml	0.3	-
アセチルシステイン、mg/ml	-	3
pH	7	6
ヘッドスペース	N ₂	N ₂
V I I I ; C I U / m l		
初期	105	108
3ヶ月、7℃	99	105
6ヶ月、7℃	90	91
2ヶ月、25℃	85	78
3ヶ月、25℃	78	66

両溶液は7℃で6ヶ月後V I I I : Cの許容し得る安定性を付与した。

例3. グルタチオンまたはアスコルビン酸を含有し、かつ空気または窒素下で貯蔵された溶液間の比較

組み換え因子V I I I が実験により説明された方法にしたがつて製造された。

溶液は25℃で貯蔵された。

ガラス瓶中に分配された量は2mlであつた。

表 3

組成は以下のごとくであつた。

	3 A	3 B	3 C	3 D	3 E	3 F
L-ヒスチジン、mM	2.27	2.27	2.27	2.27	2.27	2.27
塩化ナトリウム、mg/ml	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1
塩化カルシウム、mM	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
ポリソルベート80、mg/ml	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
グルタチオン、mg/ml	0	0	0.3	0.3	0	0
アスコルビン酸、mg/ml	0	0	0	0	4	4
pH	7	7	7	7	7	7
ヘッドスペース	N ₂	空気	N ₂	空気	N ₂	空気
V I I I ; C IU/ml						
初期	231	231	225	225	220	220
1ヶ月	212	15	203	170	169	2
2ヶ月	200	6	177	113	-	-
3ヶ月	210	-	163	-	-	-

窒素下での2ヶ月の貯蔵後、因子V I I I 活性は初期値の約80%またはそれ以上に保持された。これはグルタチオンの存在または不存在に関係ない。しかしながら、グルタチオンは、溶液がヘッドスペース中に空気により貯蔵されたとき安定性をかなり増加した。アスコルビン

酸は因子V I I I の安定性を低減した。

例4. グルタチオンの存在および不存在の、かつ空気またはアルゴン下で貯蔵された溶液間の比較

組み換え因子V I I I が実験により説明された方法にしたがつて製造された。

溶液は2つの異なる温度、それぞれ7および25℃で貯蔵された。

ガラス瓶中に分配された量は2 mlであつた。

表 4

組成は以下のごとくであつた。

	4 A	4 B	4 C	4 D	4 E	4 F
L-ヒスチジン、mg/ml	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29	2.29
塩化ナトリウム、mg/ml	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1
塩化カルシウム、mM	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
ポリソルベート80、mg/ml	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
グルタチオン、mg/ml	-	0.6	0.6	-	0.6	0.6
pH	7	7	7	7	7	7
貯蔵温度、℃	25	25	25	7	7	7
ヘッドスペース	A r	A r	空気	A r	A r	空気
V I I I ; CIU/ml						
初期	234	176	234	234	176	234
1ヶ月	213	157	133	232	172	160
2ヶ月	187	139	90	200	153	148
3ヶ月	185	138	72	207	159	131
4ヶ月	158	116	-	186	144	125
6ヶ月	149	111	-	188	147	114
9ヶ月	-	-	-	130	106	67

アルゴン下での6ヶ月の貯蔵後、因子V I I I 活性は25℃での貯蔵後初期値の約60%またはそれ以上に保持された。7℃での貯蔵後、対応する値は80%またはそれ以上であつた。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 94/00265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC : A61K 35/16, A61K 37/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC : A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, WPI, WPIL, US PATENTS FULLTEXT DATABASES		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, A, 4727027 (GARY P. WIESEHAHN ET AL), 23 February 1988 (23.02.88), column 2, line 10; column 2, line 42 - line 52; column 4, line 41 - line 58, claims 6,11, example II --	1-22
X	EP, A1, 0212040 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE), 4 March 1987 (04.03.87), column 4, line 14 - line 37; page 4, claim 1 --	1-22
A	EP, A1, 0508194 (BEHRINGWERKE), 14 October 1992 (14.10.92), page 2, line 41 - page 3, line 3 -----	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 August 1994		24-08-1994
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Carolina Palmcrantz Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/07/94

International application No.

PCT/SE 94/00265

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4727027	23/02/88	AU-B- 563557	16/07/87
		AU-A- 2752184	08/11/84
		CA-A- 1224622	28/07/87
		EP-A,B- 0124363	07/11/84
		SE-T3- 0124363	
		US-A- 4748120	31/05/88
		US-A- 5176921	05/01/93
EP-A1- 0212040	04/03/87	SE-T3- 0212040	
EP-A1- 0508194	14/10/92	AU-A- 1470292	15/10/92
		DE-A- 4111393	15/10/92
		JP-A- 5097702	20/04/93

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TT, UA, US, UZ, VN